

ARTICLE

Enterococcus faecalis EF-2001 유산균 사균체 첨가 발효유의 항염증 효과

강효진 · 김태운 · 주진우 · 김거유*

강원대학교 동물생명과학대학 동물응용과학과

Anti-Inflammatory Effects of Fermented Milk Supplemented with Heat-Killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 Probiotics

Hyo-Jin Kang, Tae-Woon Kim, Jin-Woo Jhoo, and Gur-Yoo Kim*

Dept. of Applied Animal Science, College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, Korea



Received: June 19, 2020

Revised: June 23, 2020

Accepted: June 23, 2020

*Corresponding author :

Gur-Yoo Kim

Department of Applied Animal Science,
College of Animal Life Sciences,
Kangwon National University,
Chuncheon, Korea

Tel : +82-33-250-8647

Fax : +82-33-259-5574

E-mail : gykim@kangwon.ac.kr

Copyright © 2020 Korean Society of Dairy Science and Biotechnology.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Hyo-Jin Kang

<https://orcid.org/0000-0002-1682-6689>

Tae-Woon Kim

<https://orcid.org/0000-0002-5778-9175>

Jin-Woo Jhoo

<https://orcid.org/0000-0001-6793-8413>

Gur-Yoo Kim

<https://orcid.org/0000-0001-9973-3367>

Abstract

This study was conducted to verify the physiological activity of heat-killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 probiotics in fermented milk. The anti-inflammatory effects of fermented milk supplemented with different concentrations (0, 100, and 500 µg/mL) of *E. faecalis* EF-2001 were determined using MTT assay and nitric oxide inhibition assay. The MTT assay was performed using RAW 264.7 cells. Results revealed that the rates of cytotoxicity and cell survival decreased significantly with increase in the concentration of heat-killed probiotics ($p < 0.05$). Moreover, fermented milk supplemented with 100 µg/mL EF-2001 (EFM1) and the fermented milk supplemented with 500 µg/mL EF-2001 (EFM2) exhibited higher nitric oxide inhibition than normal fermented milk (NFM). Additionally, EFM2 significantly reduced the ratio of prostaglandin E₂ compared to NFM ($p < 0.05$). In conclusion, the treatment sample showed higher anti-inflammatory activity than NFM. The findings of this study could be used as a basic guideline for manufacturing of NFM supplemented with heat-killed probiotics.

Keywords

fermented milk, lactic acid bacteria, heat-killed probiotics, anti-inflammatory

서론

2017년 이후 대한민국은 고령사회에 진입함에 따라 건강에 대한 중요성이 점차 증가하여 건강지향적 식품에 대한 소비자들의 관심이 높아졌으며, 간편식 등에 따른 식생활 변화와 만성질환의 증가로 그 중요성은 더욱 대두되었다[1]. 건강에 대한 관심도 높아지고 생활수준도 향상됨에 따라 소비자들은 유기농 및 친환경적인 식품에 대한 선호도가 높아지는 추세이며, 식품안전성에 대한 욕구가 크게 증가하고 있다[2]. 이에 따라 살아있는 비병원성 균주인 probiotics와 그 영양원인 prebiotics가 합쳐진 synbiotics가 주목받고 있으며, 발효유는 가장 쉽게 섭취할 수 있는 대표적인 synbiotics 중 하나로 알려져 있어 관련 시장규모가 증가하고 있는 추세이다[3]. 발효유 시장은 국내에서 꾸준히 성장하고 있는 유일한 품목으로 위장 건강을 위한 기능성 발효유가 가장 크게 성장하고 있다. 인체에 유용한 프로바이오틱 유산균을 이용한 발효유 제품의 연구개발은 중요한 연구 주제이며, 발전 가능성이 높다[4]. 발효유는 유성분 외에도 유산균 작용으로 인해 생성되는 lactic acid, peptone, peptides, oligosaccharides 등과 유산균 자체의 효능이 있어 영양학적으로 우유보다 우수하다[5].

최근에는 유산균의 생균뿐 아니라, 사균체와 유산균 대사산물의 *in vivo*, *in vitro* 면역 조절기능에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 사균체가 보관에 용이하고 이용이 편리하다는 연구가 있다[6]. 현재 국내의 유산균 사균체는 외국에 비해 연구가 부진한 상황이지만, 사균체를 천연물 원료로 인식하고, 일반 식품을 비롯하여 건강기능식품과 제약 등 적용 범위가 넓어지고 있다[7]. 열처리 유산균 사균체 중 1 g당 7조 5천억 개의 유산균을 갖는 *Enterococcus faecalis* EF-2001은 사전연구를 통해 알려진 주요 활성으로 항염증작용과 감염억제작용[6] 및 항종양과 면역 강화작용[8], 염증성 장 질환 개선[9], 근육위축증회복[10], 위손상보호[11], 아토피 피부개선[12] 등 다양한 생리활성을 지닌다는 연구가 보고된 바 있다.

생체 내 호흡이나 외부의 자극으로 인해 활성산소종과 활성질소종의 과대 생성에 의한 산화적 스트레스가 염증을 유발하고, 체내에서 비가역적 병변을 일으키며, 염증반응에 관여하는 세포는 대식세포 비만세포, 혈소판 세포 등이 있으며, 염증 자극으로 염증 매개 인자가 유리된다[13]. 염증반응이 일어날 시 여러 가지 염증 인자들이 만들어지게 되는데, 염증 인자에는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 만들어지는 nitric oxide(NO)와 cyclooxygenase2(COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin E₂(PGE₂) 등이 있으며, 이러한 염증 인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- κ B(NF- κ B)를 활성화해 그 결과로 과량의 NO와 PGE₂를 생성하여 염증을 일으킨다고 보고되어 있다[14].

Choi 등[6]은 EF-2001 열처리 사균체를 RAW 264.7 cell을 이용해 분자 기전을 연구한 결과, 항염증 효과를 가진 것을 확인하였고, 염증 질환 치료에 유용이 활용될 수 있다고 보고한 바 있다.

현재 국내에서는 사균체를 첨가한 식품이나 의약품 등은 판매되고 있지만, 사균체를 발효유에 첨가하여 이에 대한 기능성을 평가한 연구는 아직 보고된 바 없다. 이를 토대로 본 연구는 발효유에 *Enterococcus faecalis* EF-2001 유산균 사균체를 첨가하였을 시 발효유 및 유산균 사균체의 항염증 효과가 지속되는지에 관한 연구를 하고자 실시하였다.

재료 및 방법

발효유 제조는 마트에서 시유(서울우유협동조합, Korea)와 탈지분유(서울우유협동조합, Korea)를 구매하여 사용하였다. 발효유에 첨가하는 starter 균주는 동결건조되어 있는 유산균으로 *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp.를 비롯한 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus* 균이 혼합된 Lyofast YAB 450 AB(Sacco srl., Italy) 제품을 구매하여 사용하였다. 1 g당 7조 5천억 개의 유산균이 들어있는 *Enterococcus faecalis* EF-2001(Nihon Berumu, Japan)은 동결 건조 형태로 제조된 제품을 사용하였다. 이는 발효유에 첨가된 열처리 사균체이다. 유산균 저장온도는 -20℃로 deep freezer에 넣어 보관하였다.

1. 발효유의 제조

발효유의 조성은 Table 1과 같으며, 발효유의 제조 공정은 Fig. 1과 같다. 발효유의 무지 고형분을 12%로 맞춘 배합비에 있는 stater 균주와 사균체를 제외한 모든 원료를 혼합 후, 95℃에서 10분간 살균하였다. 그 후 37℃로 냉각하여 동결건조 유산균 Lyofast YAB 450 AB(Sacco srl., Italy)를 0.002%(w/v)의 농도로 접종을 하였다. 실험군에는 *Enterococcus faecalis* EF-2001(Nihon Berumu, Japan)을 추가로 첨가하여 최종적으로 농도가 100 μ g/mL, 500 μ g/mL가 되도록 접종하였다. 접종 후 incubator에서 37℃로 12시간을 배양하였고, 발효 완료된 sample은 냉장고에서 4℃ 온도로 7일간 보관 후 -20℃ 온도의 deep freezer에서 보관하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Experimental design of fermented milk

Ingredient	Group		
	NFM	EFM1	EFM2
Fermentation temperature	37°C	37°C	37°C
Milk (mL)	95.95	95.95	95.95
Skim milk powder (g)	4.05	4.05	4.05
Starter (mg)	3	3	3
EF-2001 (mg)	-	10	50

NFM, normal fermented milk; EFM1, fermented milk added with 100 µg/mL concentration of EF-2001; EFM2, fermented milk added with 500 µg/mL concentration of EF-2001; Starter, Lyofast YAB 450 AB (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp); EF-2001; *Enterococcus faecalis* EF-2001.

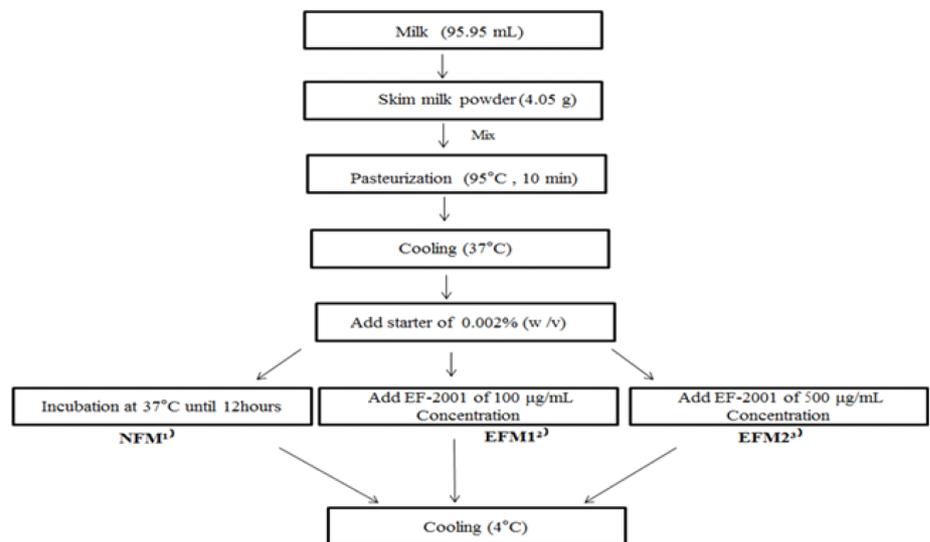


Fig. 1. Manufacturing procedure of fermented milk.

2. 항염증 효과 분석

본 연구에 RAW 264.7 cell(American Type Culture Collection, USA)을 분양받아 사용하였다. 세포배양을 위해 fetal bovine serum(Sigma-Aldrich, USA)과 penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM 배지, Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였다. 항염증 효과측정을 위해 세포독성 및 NO 생성량에 필요한 lipopolysaccharides(LPS, Sigma-Aldrich, USA)와 3-[4,5-dimethyl thiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich, USA) 및 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich, USA)이 사용되었다. PGE₂ 측정에 ELIAS kit(R&D Systems, USA)가 사용되었다.

1) 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell은 American Type Culture Collection(Manassas, USA)사에서 분양받았다. 액체질소에 보관되어 있던 RAW 264.7 cell stock을 사용하여 cell을 배양하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin/streptomycin(Sigma-Aldrich, USA)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지에 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하며, 배양기(HERAcell 150, Thermo Electron Corp., USA)에서 배양하였다. 세포실험을 위해서 세포의 계대배양은 80%-90% 정도의 밀도로 세포가 자랐을 때 계대배양을 실시하였으며, 계대배양 시

passages 조건은 20회 이하의 것을 사용하였다.

2) 세포독성 측정

사균 첨가 발효유의 세포의 생존율을 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich, USA) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 대식세포를 96 well plates에 3×10^5 cells/well의 농도로 분주 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 incubator를 통해 24시간 동안 배양하였다. 세포가 바닥에 붙었는지 확인 후 배지를 제거한 후 무혈청 DMEM 배지를 이용해 EFM2 sample을 농도별(0, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 17, 및 20 µg/mL)의 농도로 세포에 처리하여 37°C, CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 plate에 sample을 제거한 후 MTT 용액(5 mg/mL) 20 µL와 PBS(Gibco, USA) 180 µL를 96 well-plate에 넣어 4시간 동안 37°C, CO₂ incubator에서 반응시켰다. 이후 상등액을 제거한 후 형성된 formazan을 DMSO 200 µL를 분주 후 용해시켜 540 nm에서 microplate reader를 이용해 흡광도를 측정하였다. 결과로 나온 흡광도 값은 다음의 식에 대입하여 세포의 생존율을 계산하였으며, 이후 사균 첨가 발효유의 sample의 농도를 선정하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} \\ (\text{cell viability}) = \frac{\text{시료 처리 군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

3) NO(Nitric oxide) 억제능 측정

NO 생성 억제능은 NO detection kit(iNtRON biotechnology, Korea)를 사용하여 사균 첨가 발효유의 NO 억제능을 측정하였다. RAW 264.7 cell을 DMEM(1% penicillin, 10% FBS) 배지를 이용해 24 well-plate에서 세포농도 1×10^6 cells/well이 되도록 분주하였다. 그 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator(HERAcell 150, Thermo Electron, USA)에서 배양하였다. 이후 상등액을 제거한 후 사균 발효유 sample을 5, 10, 15 µg/mL 농도를 무혈청 DMEM 배지를 이용하여 LPS 1 µg/mL와 함께 처리 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 재배양하였다. 배양된 상등액 100 µL를 얻은 후 96well-plate에서 griess 시약 50 µL N1 buffer(substrate solution)을 첨가해 5분 반응 후, griess 시약 50 µL N2(coloring solution)를 넣어 반응을 시켰다. 반응이 완료된 plate는 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 세포배양 내의 생성된 NO 농도는 Nitrite Standard의 농도별 표준 곡선과 비교하여 값을 산출하였다.

4) Prostaglandin E₂(PGE₂) 측정

PGE₂는 ELISA kit(RnD system, USA)를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell을 DMEM(1% penicillin, 10% FBS) 배지를 이용해 24 well-plate에서 세포 농도 1×10^6 cells/mL로 분주한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. 다음날 상등액을 제거한 후 사균 발효유 sample을 5, 10, 15 µg/mL 농도를 무혈청 DMEM 배지를 이용하여 LPS(1 µg/mL)와 함께 처리 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 재배양하였다. 이후 세포 배양액을 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm, 5°C, 10분의 조건에서 원심 분리된 상등액을 3배 희석하여 sample로 사용하였다. 이후 ELISA kit 제조사에 의해 제시된 실험방법을 이용하여 PGE₂ 억제능을 측정하였다. Standard는 PGE₂ standard의 표준 곡선을 작성해 최종 결과값은 PGE₂ concentration value (ng/mL)로 나타내었다.

3. 통계분석

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 23(SPSS Inc., USA)을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며,

집단 간 비교를 위한 사후분석은 Tukey의 b로 검증하였고 $p < 0.05$ 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다. 모든 분석항목은 3회 이상 반복 시험하여 얻은 결과를 평균±표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 항염증 효과 변화

1) 사균 첨가에 따른 발효유의 RAW 264.7 대식세포의 세포 생존율 변화

사균 첨가 발효유의 항염증 효과를 확인하기 위해 사균 첨가 발효유의 세포독성을 확인하기 위해 RAW 264.7 cell의 세포 생존율을 MTT assay를 통해 확인하였다. MTT에 의한 세포 성장률의 측정은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 탈수소 효소 작용 때문에 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium이 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide]으로 환원되는 정도를 측정하는 검사법으로 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아 있고, 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것으로 알려져 있다[15]. Cell Viability는 80% 이상의 세포 생존율을 독성이 없을 것이라 가정하여 실험을 진행하였으며, 사균 첨가 발효유의 세포 생존율의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 농도 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 20 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 80% 이상의 세포 생존율을 보였으며, 이후의 농도에서는 80% 이하의 세포 생존율을 나타냈다. 따라서 항염증 실험을 위한 sample의 농도설정은 80% 이상의 세포 생존율을 보인 5, 10, 15 $\mu\text{g/mL}$ 를 농도로 설정해 실험을 진행하였다.

2) 사균 첨가에 따른 발효유의 Nitric oxide(NO) 생성 억제 활성 변화

RAW 264.7 대식세포에서 LPS 자극 시 inducible nitric oxide synthase(iNOS)가 발현되어 생기는 NO는 염증반응을 촉진해 조직손상을 유발한다고 알려져 있다[16]. 이를 통해 염증 유발물질로 사용되는 LPS를 처리하여 염증 유발농도에 대해 조사하였다. NO는 적정 수준에서는 면역조절, 혈관

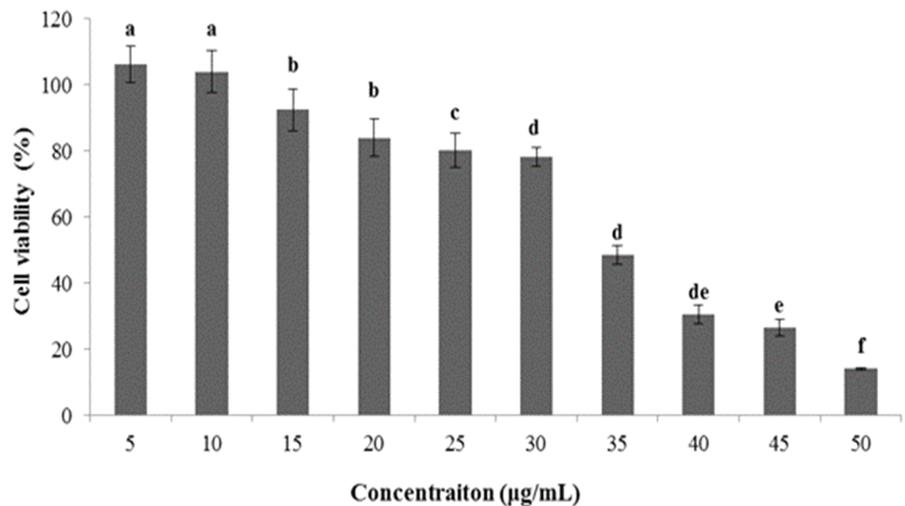


Fig. 2. Cell viability of RAW 264.7 cells with different levels of EF-2001 supplementation. Concentration of EF-2001 in 5–50 $\mu\text{g/mL}$. Values are mean of five replicate determination ($n=5$) \pm SD. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). EF-2001, *Enterococcus faecalis* EF-2001.



확장 등의 역할을 하지만 과량 생성은 염증반응을 촉진하여 병적 반응을 일으킨다[17]. 이 기작을 바탕으로 EF-2001 유산균을 첨가한 발효유의 NO 생성 억제 효과를 알아보기 위해 측정하였다. NO 생성량 측정을 위해서 MTT assay 측정결과, 세포독성을 나타내지 않은 농도인 5, 10, 15 µg/mL에 LPS로 유도를 한 후 Griess reagent를 이용해서 측정해 생성된 NO의 양의 결과를 Fig. 3에 나타내었다. LPS 처리 구의 NO 생성량은 93 µM이며, LPS를 처리하지 않은 control의 경우에는 2 µM로 적은 양을 나타냈다. 이를 통해 LPS 처리는 NO 생성을 유도하는 결과를 확인할 수 있었다. 사균 발효유의 농도별 NO 생성량의 경우 LPS 처리구보다 감소하였으며, 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였으나, 10 µg/mL과 15 µg/mL의 농도에서는 유의차는 존재하지 않았다($p < 0.05$). 또한, 일반 발효유인 normal fermented milk(NFM)의 경우에도 LPS 처리구보다 NO 생성량을 억제시켰지만, 사균을 첨가한 발효유의 10 및 15 µg/mL 농도보다 NO 생성량이 높았다. Choi 등[6]의 연구에서는 *Enterococcus faecalis* EF-2001 첨가량에 따라 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소하는 결과를 보고하였다. 본 연구와 비교해 보았을 때 사균 첨가한 발효유도 사균 첨가량에 따라 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소하는 결과를 확인함으로써 EF-2001 유산균 첨가 발효유가 NO 생성량을 억제하는 효능이 있는 것을 나타냈다.

3) 사균 첨가에 따른 발효유의 PGE₂(Prostaglandin E₂) 생성 억제능 변화

PGE₂는 통증과 발열의 전달에 관여하는 염증 매개물질로, phospholipase A2에 의해 유리된 arachidonic acid를 이용해 COX-1과 COX-2가 불안정한 대사산물인 prostaglandin H₂를 생성한 다음 PGE₂, prostacycline, thromboxane A로 변환된다. COX-2 유래 PGE₂는 면역 관련 세포의 활성을 유도해서 염증 반응을 일으키며, Th2 세포의 활성을 유도해 염증성 cytokine을 과도하게 생성하는 원인이 된다[18]. 사균 농도별 발효유를 RAW 264.7 cell에 분주한 뒤, LPS로 염증반응을 유도한 세포에서 염증 매개물질 PGE₂의 생성량은 Fig. 4에 나타내었다. LPS를 처리하지 않은 control에 비해 LPS를 처리한 상등액은 PGE₂ 생성량이 증가하였다. 발효유의 경우 모두 LPS 처리군

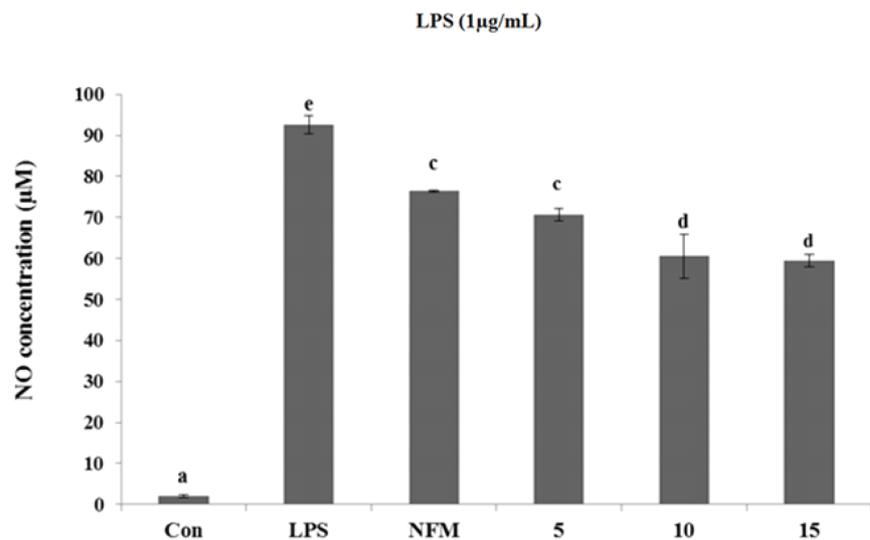


Fig. 3. Effects of added EF-2001 on nitric oxide in LPS activated RAW 264.7 cells. Concentration of added EF-2001 fermented milk is 5, 10, 15 µg/mL. Values are mean of five replicate determination (n=5)±SD. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). NFM, normal fermentation milk; EF-2001, *Enterococcus faecalis* EF-2001.

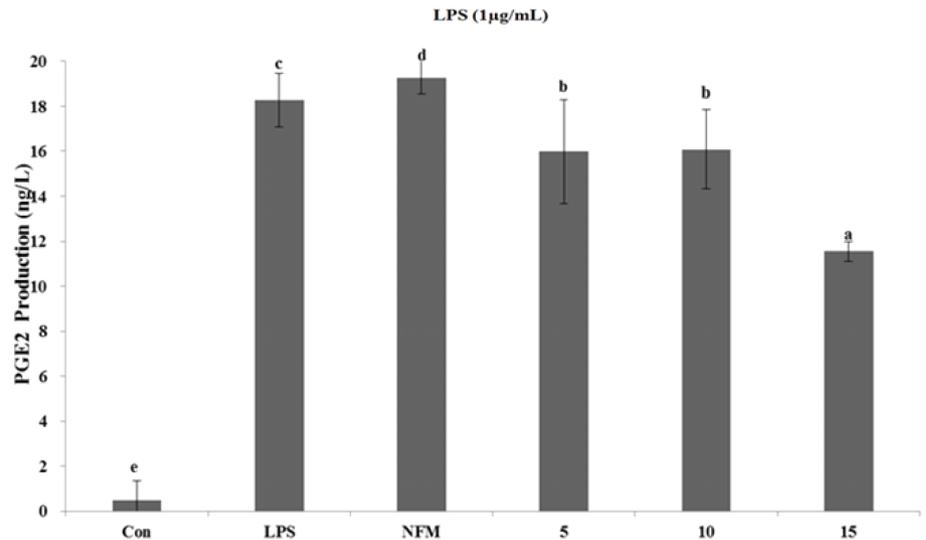


Fig. 4. Effects of added EF-2001 on prostaglandin E₂ production in LPS activated RAW 264.7 cells. Concentration of added EF-2001 fermented milk is 5, 10, 15 $\mu\text{g/mL}$. Values are mean of five replicate determination ($n=5$) \pm SD. Different letters indicate statistically significant differences ($p<0.05$). NFM, normal fermentation milk; EF-2001, *Enterococcus faecalis* EF-2001.

보다 낮은 생성량을 나타냈으며, 사균 발효유의 농도 5 $\mu\text{g/mL}$ 와 10 $\mu\text{g/mL}$ 는 유의적 차이가 없었지만($p<0.05$), 15 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 경우 11.55 \pm 0.44 ng/mL로 더욱 PGE₂ 생성이 억제된 결과를 확인하였다. 또한, 일반 발효유인 NFM의 결과와 비교해 사균 발효유의 모든 농도가 PGE₂ 생성을 억제한 결과를 통해, 발효유의 EF-2001의 첨가량에 농도 의존적으로 PGE₂의 생성이 억제되어 항염증 효과를 나타내는 결과를 나타내었다.

요약

본 연구는 *Enterococcus faecalis* EF-2001 사균체를 발효유에 첨가하였을 시 나타나는 생리활성을 검증하고자 실시하였다. 발효유는 같은 양의 starter만 넣은 일반발효유 NFM, *E. faecalis* EF-2001 사균체를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가한 EFM1, *E. faecalis* EF-2001 사균체를 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 넣은 EFM2를 제조하였다.

E. faecalis EF-2001 사균체를 발효유 첨가하였을 때 나타나는 항염증 효과를 검증하기 위해 mouse 유래 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하였다. RAW 264.7 cell을 이용한 세포독성 실험의 결과, 사균의 농도가 높아질수록 세포 생존율이 유의적으로 감소하였으며($p<0.05$), 80% 이상의 세포 생존율을 가지는 농도인 5, 10, 15 $\mu\text{g/mL}$ 에서 실험을 진행하였다. Nitric oxide의 생성 억제능 측정결과는 LPS 처리군에 비해 발효유에서 NO 생성을 저해하는 경향을 나타냈다. 또한, 일반발효유보다 사균을 첨가한 발효유에서 NO 생성을 더욱 저해하는 결과를 나타내었다. Prostaglandin E₂의 억제능 측정결과도 15 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 PGE₂ 분비량을 감소시킴을 확인하였으며, 일반발효유보다 사균이 첨가된 발효유에서 더욱 억제됨을 확인하였다.

따라서, 본 연구를 통해 *E. faecalis* EF-2001 사균체가 발효유에 첨가되어도 염증 매개물질인 NO 및 PGE₂의 생성을 감소시킴으로써 추후 사균체가 첨가된 발효유 제조 및 연구에 대한 기초 연구 결과로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.



Conflict of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

References

1. Lim CM, Joo TW, Hong SH, Park SY, Jeon GY, Jung WS, et al. Effect of high pressure processing on quality characteristics of grass-fed cow's milk. *Ann Anim Resour Sci.* 2015;26:29-41.
2. Kim DS, Oh H, Kim SY, Lee P, Kim YS. Quality characteristics and antioxidant activity of fermented milk added with cacao nibs powder. *Korea Culin Soc.* 2020; 26:55-65.
3. Yeo S, Yeo SH, Park HD. Quality characteristics, antioxidant activity and storage properties of fermented milk added with green tea powder. *Korean J Food Preserv.* 2017;24:576-584.
4. Yoon SS. Research trends and future directions for R&D vitalization of domestic dairy industry. *Korean J Dairy Sci Technol.* 2011;29:23-31.
5. Lee JW. Surface design research of functional fermented milk food. *Korea J Contents Assoc.* 2005;5:163-171.
6. Choi MS, Chang SJ, Chae Y, Lee MH, Kim WJ, Iwasa M, et al. Anti-inflammatory effect of heat-killed *Enterococcus faecalis*, EF-2001. *J Life Sci.* 2018;28:1361-1368.
7. Kim WJ. Understanding of killed lactic acid bacteria as a probiotics. *Kororean J Commun Pharm.* 2018;4:115-122.
8. Gu YH, Choi H, Yamashita T, Kang KM, Iwasa M, Lee MJ, et al. Pharmaceutical production of anti-tumor and immune-potentiating *Enterococcus faecalis*-2001 β -glucans: enhanced activity of macrophage and lymphocytes in tumor-implanted mice. *Curr Pharm Biotechnol.* 2017;18:653-661.
9. Choi EJ, Lee HJ, Kim WJ, Han KI, Iwasa M, Kobayashi T, et al. *Enterococcus faecalis* EF-2001 protects DNBS-induced inflammatory bowel disease in mice model. *PLOS ONE.* 2019;14:e0210854.
10. Chang SJ, Lee MH, Kim WJ, Chae Y, Iwasa M, Han KII, et al. Effect of heat-killed *Enterococcus faecalis*, EF-2001 on C2C12 myoblast damage induced by oxidative stress and muscle volume decreased by sciatic denervation in C57BL/6 mice. *J Life Sci.* 2019;29:215-222.
11. Jeon DB, Shin HG, Jeong SH, Kim JH, Ha JH, Park JY, et al. Effect of heat-killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 on ethanol-induced acute gastric injury in mice: protective effect of EF-2001 on acute gastric ulcer. *Hum Exp Toxicol.* 2020;39: 721-733.
12. Choi EJ, Iwasa M, Han KII, Kim WJ, Tang Y, Hwang YJ, et al. Heat-killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 ameliorates atopic dermatitis in a murine model. *Nutrients.* 2016;8:146.

13. Jung JE, Cho EJ. Enhancement of anti-inflammatory effect of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* fruits by fermentation. *J Cancer Prev.* 2011;16:263-268.
14. Yi HS, Heo SK, Yun HJ, Choi JW, Jung JH, Park SD. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *draconis resina* in mouse macrophage cells. *Korea J Herbol.* 2008;23:179-192.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;16:55-63.
16. Lim YY, Kim HM, Park WS, Kim JH, Shin HJ, Kim MN, et al. Anti-inflammatory and anti-pruritic effects of *Portulaca oleracea* L. extract using in vitro and in vivo inflammation model: LPS-treated Raw264.7 cells, keratinocytes, NC/Nga mice and hairless SKH-1 mice. *Korean J Asthma Allergy.* 2011;31:199-206.
17. Kim KH, Chung KH. Assessment of dental erosion potential by the type of fermented milk. *J Korean Soc Dent Hyg.* 2017;17:657-667.
18. Jang SII, Jun CS, Kwak KC, Bae MS, Lee JH, Kim KY, et al. Evaluation of Korean phytomedicinal plants on inhibition of prostaglandin E2 (PGE2) production and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated U937 cells. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2006;20:455-459.